

PCT/JP 2004/019453

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

17.12.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2004年 3月 2日

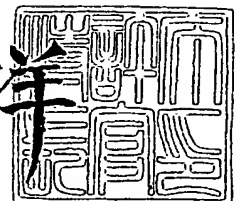
出 願 番 号
Application Number: 特願2004-057108
[ST. 10/C]: [JP 2004-057108]

出 願 人
Applicant(s): 株式会社ニッピ

2005年 3月 3日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



出証番号 出証特2005-3004062

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願
【整理番号】 040111
【提出日】 平成16年 3月 2日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 B01L
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都足立区千住緑町 1丁目 1番地 1号 株式会社ニッピ内
 【氏名】 山本 卓司
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都足立区千住緑町 1丁目 1番地 1号 株式会社ニッピ内
 【氏名】 牛木 祐子
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都足立区千住緑町 1丁目 1番地 1号 株式会社ニッピ内
 【氏名】 服部 俊治
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都足立区千住緑町 1丁目 1番地 1号 株式会社ニッピ内
 【氏名】 入江 伸吉
【特許出願人】
 【識別番号】 000135151
 【氏名又は名称】 株式会社ニッピ
【代理人】
 【識別番号】 100089705
 【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目 2番 1号 新大手町ビル 206区
 ユアサハラ法律特許事務所
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 社本 一夫
 【電話番号】 03-3270-6641
 【ファクシミリ番号】 03-3246-0233
【選任した代理人】
 【識別番号】 100076691
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 増井 忠弐
【選任した代理人】
 【識別番号】 100075270
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 小林 泰
【選任した代理人】
 【識別番号】 100080137
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 千葉 昭男
【選任した代理人】
 【識別番号】 100096013
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 富田 博行
【選任した代理人】
 【識別番号】 100093089
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 佐久間 滋

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 051806

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 特許請求の範囲 1

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9103192

【審類名】特許請求の範囲**【請求項 1】**

試料を破碎するための器具において、
両端が開口する貫通穴を有する筒状体と、
前記筒状体の一端側において前記貫通孔内に取り付けられたフィルタ部材と、
前記筒状体の前記穴内に他端側から滑動自在に密封して挿入される押圧部材と、を備え

、
前記押圧部材が前記押圧部材と前記フィルタ部材との間に配置された前記試料を前記フィルタ部材に対して押圧するよう前記押圧部材に力を作用させて、前記フィルタ部材内に前記試料を強制的に通過させ、前記試料を破碎することを特徴とする試料破碎器具。

【請求項 2】

請求項 1 記載の試料破碎器具において、前記押圧部材に作用させる力は、遠心力である試料破碎器具。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載の試料破碎器具において、前記押圧部材は、試料に面する端面に、半径方向に伸びる突部が設けられ、前記力により前記フィルタ部材内に前記試料を強制的に通過させる前に、前記押圧部材を前記フィルタ部材に関して回転させながら押圧することにより前記試料を擦り潰し可能である試料破碎器具。

【請求項 4】

請求項 1 乃至 3 の何れか 1 項に記載の試料破碎器具において、溝が、前記押圧部材の試料側先端近傍の外周面上に周方向に伸びるよう設けられ、O-リングがその溝に嵌められた試料破碎器具。

【請求項 5】

請求項 1 乃至 4 の何れか 1 項に記載の試料破碎器具において、前記フィルタ部材は、軸直交断面の直径が 50 乃至 200 マイクロメートルである複数の貫通孔を有する試料破碎器具。

【請求項 6】

請求項 1 乃至 5 の何れか 1 項に記載の試料破碎器具において、前記フィルタ部材は、厚さ 1 乃至 3 ミリメートルの板状である試料破碎器具。

【請求項 7】

請求項 1 乃至 6 の何れか 1 項に記載の試料破碎器具において、前記フィルタ部材が前記筒状体から脱落することを防止するための脱落防止部が、前記筒状体の一端開口部近傍に設けられた試料破碎器具。

【請求項 8】

試料を破碎する方法において、
両端が開口する貫通穴の一端側にフィルタ部材が取付けられた筒状体を用意するステップと、
前記筒状体の穴内に他端開口部側から前記試料を配置するステップと、
前記他端開口部側から押圧部材を滑動自在に密封して挿入するステップと、
前記押圧部材が前記試料を前記フィルタ部材に対して押圧するよう前記押圧部材に遠心力を作用させて、前記試料を前記フィルタ部材内に強制的に通過させるステップと、を備える、

ことを特徴とする試料破碎方法。

【請求項 9】

請求項 8 記載の試料破碎方法において、前記押圧部材は、試料に面する端面に、半径方向に伸びる突部が設けられ、前記押圧部材に遠心力を作用させる前に、前記押圧部材を前記フィルタ部材に関して回転させながら押圧することにより試料を擦り潰すステップを更に備える試料方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】試料破碎器具及び試料破碎方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、試料を安全且つ効率よく破碎する器具及びその方法に関し、詳細にはフィルタ部材が設けられた筒状体内の試料に対して遠心力により押圧部材を押圧させて安全かつ効率良く破碎する試料破碎器具及び方法に関する。

【背景技術】

【0002】

多くの理化学分野において、試料分析に基づく研究は欠かすことのできない重要な工程である。特に生物学、とりわけ人畜の医薬品研究、診断薬研究において重要な工程である。試料を分析するには、まず試料を「破碎」して「均一化（ホモジナイズ）」することが必要である。特に生体試料について、タンパク質抽出、又はPCR分析用のRNA、DNAの調製等を行うためには、細胞膜、細胞壁等の構造支持体を物理的（機械的）に又は化学的に破碎する必要がある。ここで、「破碎」とは、「試料の組織や細胞を物理的（機械的）に破壊すること」をいい、「均一化（ホモジナイズ）」とは、「試料の組織や細胞を物理的（機械的）に破壊し、適宜緩衝液を加えて懸濁液を作成すること」をいう。

【0003】

従来の破碎法として、ポッター型ホモジナイザー（例えば、非特許文献1参照。）、ロータ・ステータ方式ホモジナイザー（例えば、非特許文献2参照。）、ボールミル（例えば、非特許文献3参照。）等の器具を使用する方法がある。

しかしながら、これら従来の破碎法では、熱が発生し、その熱が試料を変性させ得る（試料本来の特性を損い得る）。そうすると、生体内での働き及び構造を反映した分析結果を得ることができないおそれがある（特に蛋白質、核酸、及び多糖等の高分子成分は、熱による変性を避けて、均一化する必要がある。）。また、これら従来の破碎法は、試料数が増加した場合、試料同士の混交を避けるために、使用した器具を洗浄する必要がある（これらのホモジナイザーは、高価であり、「使い捨て」できないから、使用後洗浄して、複数回使用する必要がある。）。

また、特にポッター型ホモジナイザー及びロータ・ステータ方式ホモジナイザーは、操作が開放系であるから、病原性の試料を扱う場合、周囲を汚染する危険がある。

【0004】

一方、上記発生熱により試料を変性させる問題及び周囲を汚染する問題を解決し得る従来の破碎法として、キアゲン社製のキアシュレッダー（例えば、非特許文献4参照。）を用いて試料を破碎する方法がある。この方法は、遠心力によって試料をキアシュレッダー内のフィルタに対して押圧し、強制的にフィルタ内に試料を通過させて、試料を破碎する方法である。

【0005】

【非特許文献1】「研究用総合機器カタログ 70000 2001→2003」, アズワン株式会社, 2001年11月, p. 944

【非特許文献2】「研究用総合機器カタログ 70000 2001→2003」, アズワン株式会社, 2001年11月, p. 944

【非特許文献3】「研究用総合機器カタログ 70000 2001→2003」, アズワン株式会社, 2001年11月, p. 946

【非特許文献4】「QIAGENプロダクトガイド2004」, キアゲン株式会社, 2003年, p. 258

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、キアシュレッダーを用いる破碎方法は、遠心力が試料自体にしか作用しないため、フィルタに対して試料を押圧する力は小さい。したがって、この方法によれば

、他の従来の破碎方法と比較して破碎効率が悪く、適応できる試料が限られる問題がある。

【0007】

本発明は、破碎効率を悪化させることなく、上記発生熱により試料を変性させる問題及び周囲を汚染する問題を同時に解決し得る安価で使い捨て可能な試料破碎器具及び試料破碎方法を提供することを目的とする。

さらに本発明は、脳組織や肝臓組織等の比較的堅い試料を効率良く破碎可能な試料破碎器具及び試料破碎方法を提供することを目的とする。

〔課題を解決するための手段及びその効果〕

【0008】

(1) 上記問題点を解決するための本発明の試料を破碎するための器具は、両端が開口する貫通穴を有する筒状体と、前記筒状体の一端側において前記貫通孔内に取り付けられたフィルタ部材と、前記筒状体の前記穴内に他端側から滑動自在に密封して挿入される押圧部材と、を備え、前記押圧部材が前記フィルタ部材と前記フィルタ部材との間に配置された前記試料を前記フィルタ部材に対して押圧するよう前記押圧部材に力を作用させて、前記フィルタ部材内に前記試料を強制的に通過させ、前記試料を破碎することを特徴とする。

したがって、本発明の試料破碎器具によれば、簡単な構造であるからその製造コストを低減でき、使い捨てが可能であり、同じ器具を複数の試料の「破碎」に供して、試料同士が混交することを防止し得る効果がある。

また押圧部材が筒状体の穴内に密封して挿入されるから、試料の逆流を防ぎ、実施者の安全の確保、及び周辺環境への汚染を防止し得る効果がある。

さらに、フィルタ部材内に試料を強制的に通過させる際に、押圧部材に力を作用させるから、試料の「破碎」効率を向上し得る効果がある。

(2) 好ましくは、前記押圧部材に作用させる力は、遠心力である。

したがって、本発明の試料破碎器具により試料を「破碎」する際、市販の遠心分離機を使用可能であるから、作業内容を簡便化し得るとともに、複数の試料を同時に「破碎」することができるから、作業効率を上げ得る効果がある。

(3) また好ましくは、前記押圧部材は、試料に面する端面に、半径方向に伸びる突部が設けられ、前記力により前記フィルタ部材内に前記試料を強制的に通過させる前に、前記押圧部材を前記フィルタ部材に関して回転させながら押圧することにより前記試料を擦り潰し可能である。

したがって、試料を事前に擦り潰すから、試料（特に脳組織や肝臓組織等の比較的堅い試料）「破碎効率」を上げ得る効果がある。

(4) また好ましくは、溝が、前記押圧部材の試料側先端近傍の外周面上に周方向に伸びるよう設けられ、Oリングがその溝に嵌められている。

したがって、押圧部材により、筒状体の穴を確実に密封し得る効果がある。

(5) また好ましくは、前記フィルタ部材は、軸直交断面の直径が50乃至200マイクロメートルである複数の貫通孔を有する。

したがって、所望の試料を「破碎」し得る効果がある。

(6) また好ましくは、前記フィルタ部材は、厚さ1乃至3ミリメートルの板状である。

したがって、所望の試料を「破碎」し得るとともに、フィルタ部材が所望の強度を有する効果がある。

(7) また好ましくは、前記フィルタ部材が前記筒状体から脱落することを防止するための脱落防止部が、前記筒状体の一端開口部近傍に設けられている。

したがって、試料を「破碎」する際、フィルタ部材が前記筒状体から脱落することを防止し得る効果がある。

【0009】

(8) 上記問題点を解決するための本発明の試料を破碎する方法は、両端が開口する貫通穴の一端側にフィルタ部材が取付けられた筒状体を用意するステップと、前記筒状体の穴内に他端開口部側から前記試料を配置するステップと、前記他端開口部側から押圧

部材を滑動自在に密封して挿入するステップと、前記押圧部材が前記試料を前記フィルタ部材に対して押圧するよう前記押圧部材に遠心力を作用させて、前記試料を前記フィルタ部材内に強制的に通過させるステップと、を備える、ことを特徴とする。

この方法による効果は大略、上記(1)及び(2)に記載した効果と同様である。

(9) 好ましくは、前記押圧部材は、試料に面する端面に、半径方向に伸びる突部が設けられ、前記押圧部材に遠心力を作用させる前に、前記押圧部材を前記フィルタ部材に関して回転させながら押圧することにより試料を擦り潰すステップを更に備える。

この方法による効果は大略、上記(3)に記載した効果と同様である。

【実施例】

【0010】

本発明に係る試料破碎器具の一実施形態を図1乃至図5を使用して説明する。

図1中、試料破碎器具1は大略、筒状体としての破碎用チューブ11と、フィルタ部材としてのフィルタ12と、押圧部材としての破碎棒20とからなる。

【0011】

図1中、破碎用チューブ11は、テーパ部11dとその縮径側端部から伸びる円筒部11eとからなる一体成型（例えば、射出成形）されたプラスチック製の両端が開口（11b及び11f）する貫通穴を有する略円筒体である。ここで、テーパ部11dが破碎用チューブ11に設けられた理由は、破碎棒20を破碎用チューブ11に対して挿入しやすくするためである。また、破碎用チューブ11は、その中に配置された試料30を視認できるように（無色又は有色）透明であることが好ましいが、例えば試料30が光により変性しやすい性質を有する場合は、外部からの光を遮断するよう不透明でもよい。

テーパ部11dの拡張側端部（同図中、上端部）にはリング状フランジ11aが設けられ、その周上に所定距離間隔し、下端方向へ伸びる2つの爪状固定部11cが設けられる。円筒部11eの下端開口部11fは、図3に示す如く、互いに直行するよう直径方向に伸びる2枚の板状の脱落防止部11gが設けられる。脱落防止部11gは、試料30を破碎する際にフィルタ12が脱落するのを防止する。なお、脱落防止部11gは、例えば、半径方向内方へ伸びる突部（図示せず）等の他の構成でもよいし、また設けられなくともよい。なお、破碎用チューブ11は他の材質でもよい。また破碎用チューブ11は、テーパ部11dを有さない円筒体でもよいし、またフランジ11aを有さなくともよい。

【0012】

円盤状フィルタ12は、円筒部11eの内径より僅かに大きい外径を有し、脱落防止部11g上の円筒部11eの内周面に嵌着される。フィルタ12は、軸直交断面の直径が50マイクロメートル～200マイクロメートルの貫通孔が設けられた厚み1mm～3mmの市販のポリプロピレン製又はガラス製の硬質フィルタである。なお、フィルタ12は、ポリプロピレン製の場合、例えば、ドイツのポーレックス（POREX）社製フィルタであり、またガラス製の場合、例えば、柴田科学社製フィルタであるから、詳細な説明を省略する。勿論、フィルタ12の構成及び材質は、試料30に適合する他の所望の構成及び材質のものでよい。

【0013】

破碎棒20は大略、破碎棒本体21、及びOーリング22からなり、破碎用チューブ11に滑動自在に且つ回転自在に密封挿入される。なお、破碎棒20は、破碎用チューブ11に対して回転自在でなくともよい。破碎棒本体21は、把持部21a、接続部21c、及び試料押圧部21dが一体成型（例えば、射出成形）されたプラスチック製のものである。把持部21aは、円柱であり、実施者が破碎棒20を回転させやすいように周方向等分割（同図中、12分割）位置にローレット21bが設けられる。なお、ローレット21bは設けられなくともよいし、また把持部21aは、実施者が持ちやすい多角形柱状体（図示せず）等の他の柱状体でもよい。接続部21cは、周方向4分割位置に4枚の平板が配設された柱状体である。なお、接続部21cは、他の多角形柱状体（図示せず）でもよい。

【0014】

押圧部 21d は、破碎用チューブ 11 の円筒部 11e の内径より僅かに小さい外径を有する円柱であり、その試料側先端（同図中、下端）近傍の外周面に周方向に伸びる溝 21e が設けられる。溝 21e には、Oリング 22 が嵌められ、破碎棒 20 が破碎用チューブ 11 に挿入された際に、その押圧部 21d が破碎用チューブ 11 の円筒部 11e を密封する。Oリング 22 を用いて破碎用チューブ 11（円筒部 11e）を密封する理由は、Oリング 22 を用いて破碎用チューブ 11 を密封することにより、「擦り潰し」た試料 30 の逆流を防ぎ、実施者の安全の確保、及び周辺環境への汚染を防止するためである（特に、病原性の試料を扱う場合、重要である）。なお、押圧部 21d は、Oリング 22 が設けられなくともよいが、この場合は、上記「擦り潰し」た試料 30 の逆流を防ぐため、押圧部 21d の外形は、破碎用チューブ 11 の円筒部 11e の内径と同一である（押圧部 21d が弾性材料からなる場合、押圧部 21d の外形は、円筒部 11e の内径より僅かに大きくともよい）。

【0015】

押圧部 21d の下端面 21f には、図 2 に示す如く、互いに直行するよう半径方向に伸びる（すなわち、周方向 4 分割する）4 本の突部 21g が設けられる。なお、突部 21g の本数は、4 本以外でもよいし、また無くともよい。

なお、破碎棒 20 は、一体成形しなくともよいし、プラスチック以外の他の所望材料からなってもよく、また、把持部 21a 及び押圧部 21d を直接接続してなり、接続部 21c がなくともよい。

【0016】

上述の如く、本発明の試料破碎器具は、簡単な構造であるからその製造コストを低減でき、安価であるから使い捨てが可能である。これにより、同じ器具を複数の試料の「破碎」に供して、試料同士が混交することを防止し得る（試料同士の混交を防止することは、研究及び試験を実施する場合の前提条件である）。

【0017】

次に、試料破碎器具 1 を使用した試料破碎方法を図 1、図 4 及び図 5 を用いて説明する。

破碎用チューブ 11 の穴内に他端（図 1 中、上端）開口部側からフィルタ 12 上に試料 30 を配置し、さらに同開口部側から破碎棒 20 を滑動自在に密封して挿入する。しかる後、図 4 に示す如く、試料回収用チューブ 40 に破碎用チューブ 11 を挿入する。これにより、「破碎」された試料 30 を回収用チューブ 40 に直接回収することが可能となる。なお、回収用チューブ 40 を使用せず、「破碎」された試料 30 を他の所望の採取用容器に採取してもよい。

【0018】

ここで、回収用チューブ 40 は大略、図 4 に示す如く、有底円筒体のチューブ本体 40a と、その開口端 40b から半径方向外方へ伸びるリング状フランジ 40c とからなり、市販のプラスチック製である（例えば、エッペンドルフ社製又はトレフ社製等の 1.5 ml 又は 2 ml チューブ）。フランジ部 40c は、その下面の周方向等分位置に突部 40d が設けられる。開口端 40b に嵌挿される筒状密封部 40g を有するキャップ部 40f が、可撓性接続部 40e を介してフランジ部 40c に取り付けられる。キャップ部 40f は、フック部 40h を更に有し、キャップ部 40f を閉じた際に、フック部 40h がフランジ部 40c に係合して、ロック可能である。

【0019】

なお、試料回収用チューブ 40 に破碎用チューブ 11 を挿入した際、破碎用チューブ 11 は、そのフランジ部 11a が回収用チューブ 40 のフランジ部 40c に当接し、2 つの爪状固定部 11c 間に回収用チューブ 40 の可撓性接続部 40e を位置決めして、破碎用チューブ 11 は、試料回収用チューブ 40 に対して位置決め固定される。このとき、回収用チューブ 40 のキャップ部 40f は閉じられていない。

【0020】

続いて、破碎棒 20 をフィルタ 12 に関して回転させながら押圧することにより試料 3

0を「擦り潰す」(以下、適宜「擦潰し工程」という)。なお、この「擦潰し工程」は、特に脳組織や肝臓組織等の比較的堅い試料を「破碎」する際の「破碎効率(「破碎」された試料の回収率)」を上げるのに有効であるが、この「擦潰し工程」はなくともよい(後述する[実験例1]を参照)。

【0021】

試料30を充分「擦り潰し」た後、市販の遠心分離機50を使用して、試料30を「破碎」する。すなわち、遠心分離機50の回転盤51のチューブ保持用穴51aに、試料回収用チューブ40に挿入したままの状態の破碎用チューブ11をその下端から挿入し、回転盤51を所定数回転させて、破碎棒20が試料30をフィルタ12に対して押圧するよう破碎棒20に遠心力を作用させる。

そうすると、試料30は、フィルタ12内に強制的に通過させられて、試料30が「破碎」され、回収用チューブ40に回収される(その回収後、適宜回収用チューブ40のキャップ部40fは閉じられる)。なお、破碎用チューブ11が遠心分離機50にセットされている間は、「破碎」された試料30が、回収用チューブ40から漏れ出すことはない(例えば、遠心分離機50のチューブ保持用穴51aの軸線方向は、回転盤51の回転面に対して、斜め下方向であり、上記漏出は防止される)、破碎用チューブ11及び回収用チューブ40間にシール手段(例えば、破碎用チューブ11の外側所定位置に設けられたOーリング(図示せず))を設けてもよい。

【0022】

本発明の試料破碎器具1によれば、遠心分離機50を使用して試料30を「破碎」することが可能であるから、実施者が手作業で試料を「破碎」する必要があるポッター型ホモジナイザー等と比較して、作業内容を簡便化できる。また遠心分離機50は、複数の回収用チューブ40の遠心分離を同時に行うことが可能であるから、複数の試料30を同時に「破碎」することができ、試料を1つずつ「破碎」する必要がある上記従来技術のポッター型ホモジナイザー、及びロータ・ステータ方式ホモジナイザー等と比較して、作業効率(又は作業処理速度)を上げることができる。

【0023】

なお、遠心分離機50は冷却機能付きであることが好ましい。これにより、「破碎」中に発生する摩擦熱等により試料30が熱変成することを防ぐとともに、内因性の酵素等による分解を防ぎ、「均一化された」試料30から目的物質を破損することなく抽出することができる。

また遠心分離機50を使用せず、実施者が指で破碎棒20を直接押圧する等の機械的な力により、破碎棒20を押圧してもよい。

【実験例1】

【0024】

表1は、上記従来技術のキアシュレッダー及び本発明の試料破碎器具を夫々用いて、生体試料であるウシの脳延髄組織の破碎効率(「破碎」された試料の回収率)を比較した実験結果である。すなわち、キアシュレッダーを用いて、破碎棒により試料を「擦り潰す」ことなく、試料自体に作用する遠心力のみにより試料をフィルタ内に強制的に通過させて、試料を「破碎」した際の試料の回収率と、本発明の試料破碎器具を用いて、試料自体に作用する遠心力のみならず破碎棒に作用する遠心力により試料をフィルタ内に強制的に通過させて、試料を「破碎」した際の試料の回収率とを比較した実験結果である。なお、本発明の試料破碎器具を用いた実験は、「擦潰し工程」を事前に設けた場合及び「擦潰し工程」を事前に設けない場合の2通りの条件下でおこなった。

ここで、キアシュレッダー及び本発明の試料破碎器具を用いたいずれの実験も、エッペンンドルフ形マイクロチューブ用遠心分離機を用いて、試料を10000~15000rpmの回転速度で1分間回転させることによりおこなった。

【0025】

同表中、左から(以下同様)第1列「試料重量」欄に記載の数値はキアシュレッダーに用いた実験に使用した試料の実測値であり、第2列「回収重量」欄に記載の数値はキアシ

ュレッダーを用いた実験によりフィルタを通過して回収された試料の重量であり、第3列「回収率」欄に記載の数値は上記「回収重量」を上記「試料重量」で除したものである。

他方、第4～9列の各欄に記載の数値は夫々、本発明の試料破碎器具を用いて、条件を変えて得られた実験結果である。すなわち、上記第4～6列の各欄に記載の数値は、「擦潰し工程」を事前に設けないが、破碎用チューブに破碎棒を挿入し、試料自体に作用する遠心力のみならず破碎棒に作用する遠心力により試料を「破碎」した場合の上記第1～3列の各欄に記載の数値と同様の数値であり、上記第7～9列の各欄に記載の数値は、「擦潰し工程」を事前に行い、さらに破碎用チューブに破碎棒を挿入して、破碎棒に作用する遠心力により試料を「破碎」した場合の上記第1～3列の各欄に記載の数値と同様の数値である。

【0026】

この実験結果によれば、先ずキアシュレッダーを用いた回収率と、本発明の試料破碎器具を用い「擦潰し工程」を設けない場合の回収率とを比較すると、キアシュレッダーを用いた回収率は10%程度であるのに対し、本発明の試料破碎器具を用いた回収率は概ね39～54%である(表1参照)。

すなわち、本発明の試料破碎器具を用いることにより、試料自体に作用する遠心力のみならず破碎棒に作用する遠心力により試料を「破碎」するから、従来技術(キアシュレッダー)に比較して、飛躍的に試料の回収率(破碎効率)を向上させることが可能である。

【0027】

続いて、本発明の試料破碎器具を用い、「擦潰し工程」を設けない場合の回収率と、「擦潰し工程」を設けた場合の回収率とを比較すると、「擦潰し工程」を設けない場合の回収率は概ね39～54%であるのに対し、「擦潰し工程」を設けた場合の回収率は概ね47～59%である(表1参照)。

すなわち、「擦潰し工程」を設けることにより、試料の回収率(破碎効率)をさらに向上させることが可能である。

【0028】

【表1】

キアシュレッダー			本発明の試料破碎器具					
試料重量 (mg)	回収重量 (mg)	回収率 (%)	「擦潰し工程」なし			「擦潰し工程」有り		
			試料重量 (mg)	回収重量 (mg)	回収率 (%)	試料重量 (mg)	回収重量 (mg)	回収率 (%)
109	15.1	13.9	131	70.5	53.8	131	72.8	55.6
90	10	11.1	107	55.2	51.6	107	62.7	58.6
94	9.3	9.9	130	55.2	42.5	130	60.7	46.7
106	10.9	10.3	90	34.1	37.9	90	43.9	48.8
90	7.4	8.2	90	36	40.0	90	45.1	50.1
106	7.4	7.0	130	70	53.9	130	77.3	59.5

【実験例2】

【0029】

次に、本発明の試料破碎器具を使用して、生体試料以外の試料を「破碎」した実験結果を表2に示す。

この実験の背景は、以下のとおりである。すなわち、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離されたタンパク質をさらに分析するためにはゲルからタンパク質を抽出する必要がある。ゲルからのタンパク質の抽出効率を上げるためにはゲルを破碎する必要があるが、従来、適切な破碎法がなかった。

【0030】

続いて、実験内容の具体的な説明をする。

タンパク質としてのウシ血清アルブミン (BSA) を 12% ポリアクリルアミド溶液に 0.7% となるよう溶かしこみ、スラブゲル作成装置 (厚さ 0.75 mm) 中で TEMED 及び過硫酸アンモニウムを用いて重合させる。アクリルアミドが充分重合し、ゲル化した後、ゲルを正確に 180 mg の重さに切り取る。切り取ったゲルの一方は、そのままエッペンドルフ・チューブに挿入し、他方は本発明の試料破碎器具を用いて「破碎」し回収用チューブに「破碎」したゲルを回収する。夫々のゲルに 0.5 ml の蒸留水を加え震盪した後、一定時間毎に、蒸留水に溶け出した BSA を、紫外線吸収 (280 nm) によって定量する。

【0031】

夫々のゲルからの BSA の抽出率を表 2 に示す。すなわち、同表中、上から (以下同様) 第 1 行に記載の数値は抽出時間 (経過時間) であり、第 2 行に記載の数値は「破碎」していないゲルからの BSA の抽出率であり、第 3 行に記載の数値は本発明の試料破碎器具を用いて「破碎」したゲルからの BSA の抽出率である。なお、抽出率は、ゲルに封入されていない 0.7% の BSA 溶液に 0.5 ml の蒸留水を加えた溶液の紫外線吸収を 100% として計算している。

【0032】

この実験結果によれば、上記「破碎」していないゲルは、60% 抽出するまでに 2 時間以上を要したのに対し、本発明の試料破碎器具で「破碎」したゲルは、5 分後には 60% 以上の BSA が抽出された (表 2 参照)。さらに 1 日経過後の最終的な抽出率を比較すると、上記「破碎」していないゲルは、62% であるのに対し、本発明の試料破碎器具で「破碎」したゲルは、72% であり、本発明の試料破碎器具で「破碎」したゲルの方が高い (表 2 参照)。

すなわち、生体試料以外の試料についても、本発明の試料破碎器具は、その目的に応じて簡便で効率よく試料を「破碎」することが可能である。

【0033】

【表 2】

抽出時間	5分	30分	2時間	4時間	24時間
非破碎の場合の抽出率 (%)	30	33	60	62	62
破碎の場合の抽出率 (%)	62	64	72	72	72

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図 1】本発明の試料破碎器具の一実施形態を説明するための試料破碎器具の分解斜視図である。(実施例 1)

【図 2】図 1 中、筒状体の底面部分の斜視図である。(実施例 1)

【図 3】図 1 中、押圧部材の底面部分の斜視図である。(実施例 1)

【図 4】試料破碎器具及び試料回収用チューブの分解斜視図である。(実施例 1)

【図 5】試料破碎器具がセットされた遠心分離機の斜視図である。(実施例 1)

【符号の説明】

【0035】

- 1 試料破碎器具
- 11 筒状体
- 12 フィルタ部材
- 20 押圧部材
- 30 試料

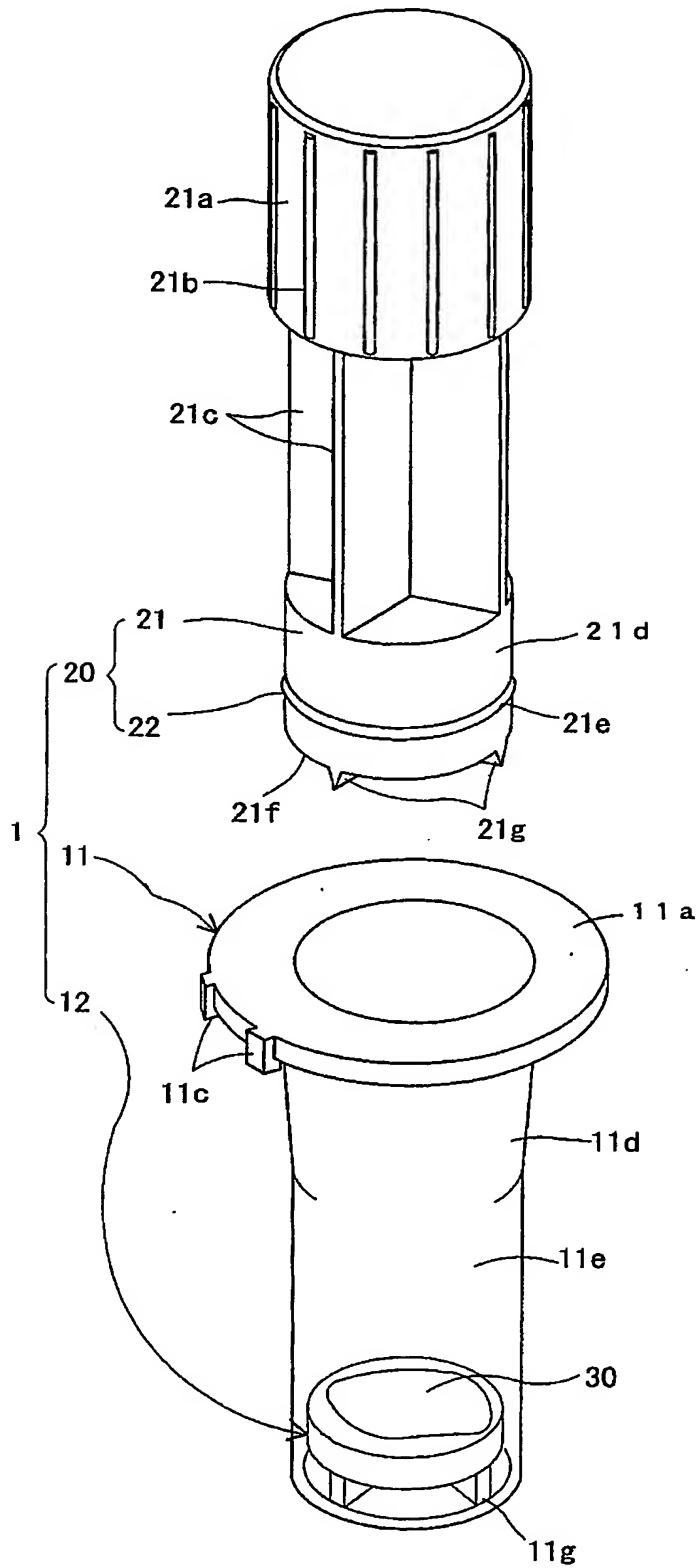
特願 2004-057108

ページ: 1/

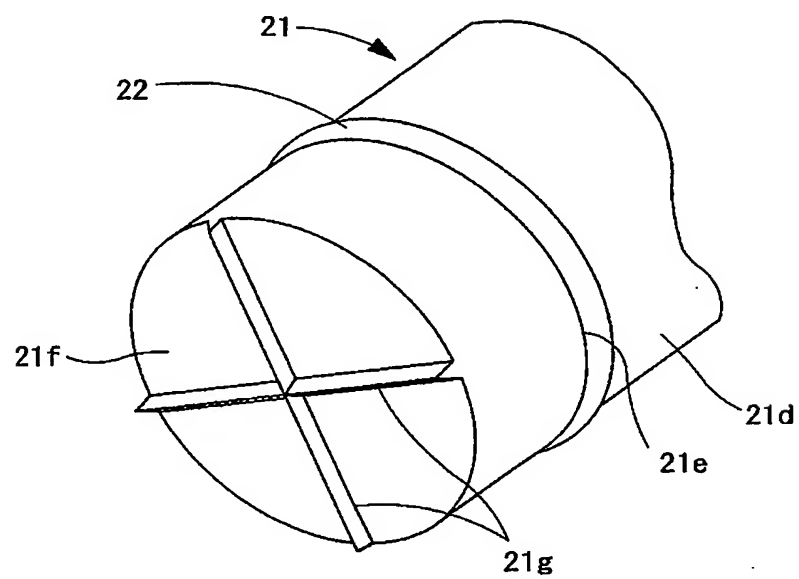
【書類名】 図面

出証特 2005-3004062

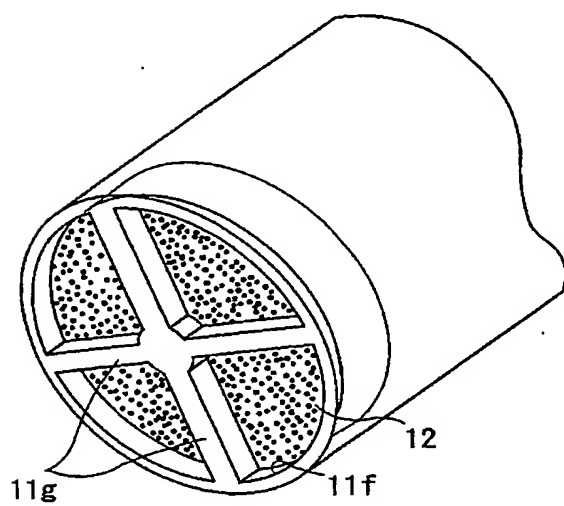
【図 1】



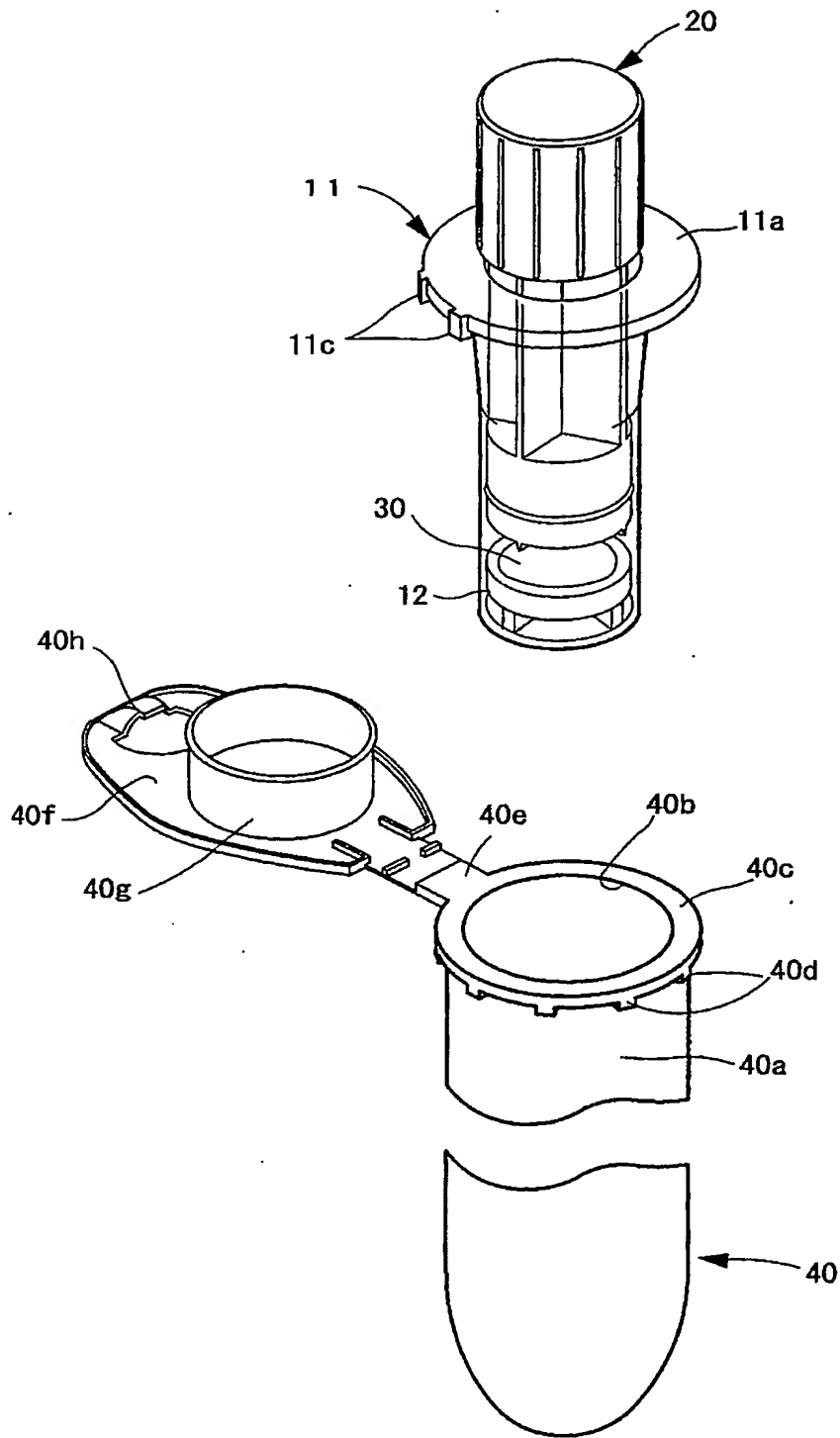
【図 2】



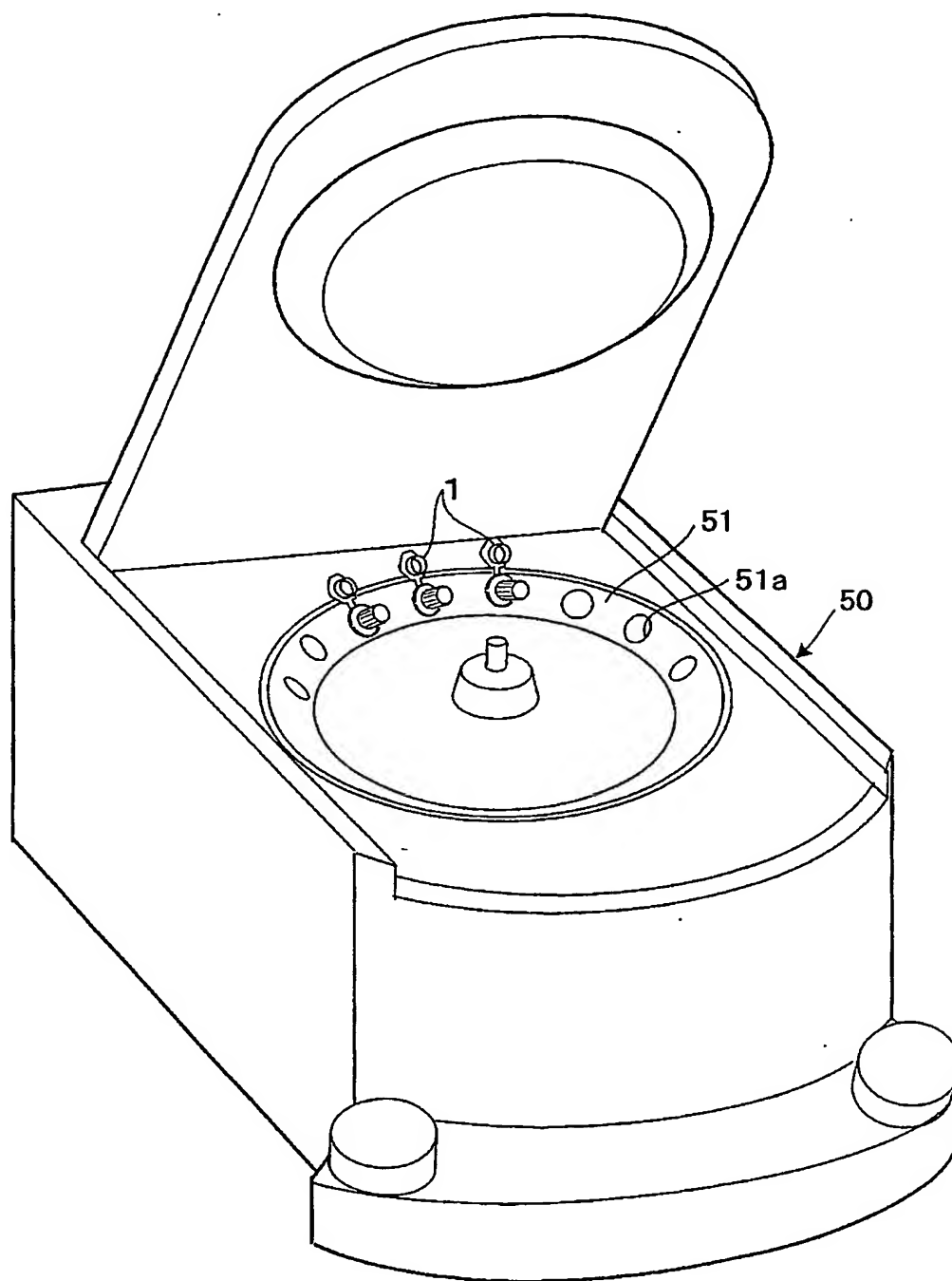
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】

本発明は、フィルタ部材が設けられた筒状体内の試料に対して遠心力により押圧部材を押圧させて安全かつ効率良く破碎する試料破碎器具及び方法を提供する。

【解決手段】

両端が開口する貫通穴を有する筒状体と、前記筒状体の一端側において前記貫通孔内に取り付けられたフィルタ部材と、前記筒状体の前記穴内に他端側から滑動自在に密封して挿入される押圧部材と、を備え、前記押圧部材が前記押圧部材と前記フィルタ部材との間に配置された前記試料を前記フィルタ部材に対して押圧するよう前記押圧部材に力を作用させて、前記フィルタ部材内に前記試料を強制的に通過させ、前記試料を破碎することを特徴とする試料破碎器具。

【選択図】 図 1

特願 2004-057108

出願人履歴情報

識別番号

[000135151]

1. 変更年月日
[変更理由]

住所
氏名

2001年 3月29日

住所変更

東京都足立区千住緑町1丁目1番地1
株式会社ニッピ

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.